

ES2053399AA: Procedure for obtaining beta-cyclodextrin derivatives[\[Spanish\]](#)

? Derwent Title: Beta-cyclodextrin derivs. prepn. - by covalent union with basic amino acids contg. protected lateral amino or guanido gps. [\[Derwent Record\]](#)

? Country: ES Spain

? Kind: AA Patent Application with search report ¹

? Inventor: TRIGUERO ROBLES DOMINGO; Spain
GARRIDO PERTIERRA AMANDO; Spain

? Assignee: UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID Spain
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

? Published /1994-07-16 / 1993-01-11

Filed:

? Application ES1993000000028

Number:

? IPC Code: IPC-7: C08B 37/16;

? ECLA Code: None

? Priority Number: 1993-01-11 ES1993000000028

? INPADOC None

Get Now: [Family Legal Status Report](#)

Legal Status:



[High
Resolution](#)

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

XP-002282995

AN - 1994-242547 [13]

AP - ES19930000028 19930111; ES19930000028 19930111

CPY - UYMA-N

DC - A96 B07

FS - CPI

IC - C08B37/16

MC - A10-E01 A12-V01 A12-W05

PA - (UYMA-N) UNIV COMPLUTENSE MADRID

PN - ES2053399 A1 19940716 DW199430 C08B37/16 000pp

- ES2053399 B1 19950216 DW199513 C08B37/16 000pp

PR - ES19930000028 19930111

XIC - C08B-037/16

AB - ES2053399 The derivs. of formula (I), in which R is H or 1-4C alkyl and Aa+ is the gp. of a basic amino acid, are made by reaction of a beta-cyclodextrin deriv. of formula (VI) or (VII) with a basic amino acid with protected lateral amino or guanido gps., in aprotic solvent under inert atmos. and in presence of dicyclohexyl carbodiimide and 1-hydroxy benzotriazole.

- USE - Molecular micro-encapsulation of drugs whose passage to the brain is restricted by the haemato-encephalic barrier.

IW - BETA CYCLODEXTRIN DERIVATIVE PREPARATION COVALENT UNION BASIC AMINO ACID CONTAIN PROTECT LATERAL AMINO GUANIDO GROUP

IKW - BETA CYCLODEXTRIN DERIVATIVE PREPARATION COVALENT UNION BASIC AMINO ACID CONTAIN PROTECT LATERAL AMINO GUANIDO GROUP

NC - 001

OPD - 1993-01-11

ORD - 1994-07-16

PAW - (UYMA-N) UNIV COMPLUTENSE MADRID

TI - Beta-cyclodextrin derivs. prepn. - by covalent union with basic amino acids contg. protected lateral amino or guanido gps.

*Corresponds to ES 2053399 (1st document of
the International Search Report)*

THIS PAGE BLANK USE



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: ES 2 053 399

⑫ Número de solicitud: 9300028

⑤ Int. Cl.⁵: C08B 37/16

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: 11.01.93

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: 16.07.94

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
16.07.94

⑦ Solicitante/es:
Universidad Complutense de Madrid
c/ Isaac Peral s/n (Rectorado)
Ciudad Universitaria
28040 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: Triguero Robles, Domingo y
Garrido Pertierra, Amando

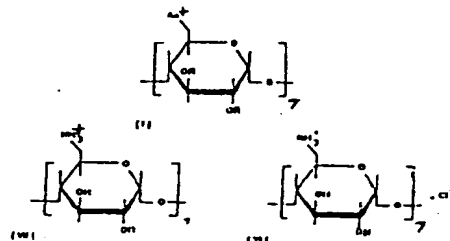
⑦ Agente: No consta

⑤ Título: Procedimiento para la obtención de derivados de Beta-Ciclodextrina.

⑤ Resumen:

Procedimiento para la obtención de derivados catiónizados de Beta-Ciclodextrina por unión covalente de residuos de aminoácidos básicos y su aplicación como vectores de fármacos al cerebro.

Procedimiento para la obtención de derivados de Beta-Ciclodextrina de fórmula general (I), donde R puede ser H o un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono; y Aa⁺ es el resto de un aminoácido básico. El procedimiento comprende la reacción entre un aminoderivado de beta-ciclodextrina de fórmula general (VI o VII) con un aminoácido básico protegido en sus grupos amino o guanido laterales, en un disolvente aprótico, en atmósfera inerte y en presencia de dicitlohexilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotrazol. Los productos de fórmula (I) pueden ser utilizados para el microencapsulamiento molecular de fármacos de que ven restringido su transporte cerebral por la presencia de la barrera hematoencefálica.



DESCRIPCION

Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento para la obtención de derivados de Beta - Ciclodextrina dotados de una carga eléctrica positiva elevada mediante la unión covalente de aminoácidos básicos y a los nuevos derivados de Beta - Ciclodextrina así obtenidos que pueden ser utilizados para el microencapsulamiento molecular de fármacos que ven restringido su transporte cerebral por la presencia de la barrera hematoencefálica, por lo que estos derivados de Beta - Ciclodextrina pueden ser utilizados como vectores de dichos fármacos mediante procesos de transcitosis inducidos por unión electrostática con los componentes de la membrana plasmática, de carga eléctrica negativa.

Antecedentes de la invención

La existencia de uniones intercelulares estrechas entre las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos intracerebrales constituye la base estructural de la barrera hematoencefálica. Dicha barrera restringe el intercambio de sustancias entre la sangre y el parénquima cerebral a procesos de intercambio transendotelial realizados gracias a la presencia de proteínas transportadoras y receptores específicos para los diferentes metabolitos, catabolitos y hormonas. Así pues, la barrera hematoencefálica permite controlar el medio extracelular cerebral dentro de estrictos límites, aislándolo de las continuas fluctuaciones en la composición del plasma sanguíneo (W. M. Pardridge 1983. *Physiol. Rev.* 63:1481 - 1535).

La existencia de esta barrera altamente selectiva se erige en el principal inconveniente frente a actuaciones terapéuticas dirigidas al sistema nervioso central, ya que, independientemente del mecanismo de acción y eficacia de un fármaco determinado, éste debe ser capaz de salvar la barrera hematoencefálica para ejercer su acción. Dicho paso es únicamente posible si el fármaco puede utilizar alguno de los transportadores a los que antes hacíamos referencia, o bien, penetre en el sistema nervioso central mediante mecanismos de difusión simple gracias a sus características fisicoquímicas: una elevada liposolubilidad unida, frecuentemente, a un pequeño tamaño (W.M. Pardridge 1986. *Endocrine. Rev.* 63:1481 - 1535). Muchas han sido las estrategias desarrolladas para permitir el acceso de fármacos al cerebro, pudiendo destacar aquellas basadas en el diseño de compuestos con similar actividad farmacológica pero de estructura ligeramente diferente a la del fármaco patrón (derivados cíclicos, sustitución de radicales hidrófilos por otros de carácter lipófilo) (E.A. Neuwelt (eds) "Implications of the Blood Brain Barrier and its manipulation. Clinical aspects." Vol. 2. Plenum Publ. Co. New York. 1989.), así como el uso de precursores capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, siendo activados y retenidos en cerebro tras su metabolización (N. Bodor and J.W. Simpkins, 1983. *Science* 221:65 - 67; W.R. Anderson et al. 1988, *Drug Design Deliv.* 2:287 - 298). No obstante, ambas estrategias se encuentran severamente limitadas al hallazgo de derivados que reúnan ambos aspectos: capacidad de transporte y suficiente eficacia terapéutica.

Recientemente ha sido descrita una nueva aproximación al problema expuesto para su aplicación al transporte de péptidos biológicamente activos a través de la barrera hematoencefálica. La carga eléctrica de una proteína puede ser modificada mediante la unión covalente de radicales amino primarios, proporcionándole una carga eléctrica neta altamente positiva (cationización). Cuando una proteína cationizada se une, electrostáticamente, a las cargas negativas que tapizan la porción luminal de una célula endotelial cerebral, se origina una reagrupación de los complejos formados seguido de la inclusión de la membrana, y la proteína unida a ella, transporte a través del citoplasma y ulterior exocitosis a la porción abluminal de la célula endotelial. Dicho proceso de transporte transcelular, conocido como transcitosis, posee características similares a las de otros procesos fisiológicos presentes en la célula para otras proteínas de importancia biológica (transferrina, lipoproteínas, insulina), a excepción de la alta especificidad para éstas últimas (D. Triguero et al. 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:4761 - 4765). La cationización ha sido propuesta como estrategia para la administración al cerebro de proteínas que posean actividad biológica intrínseca (Inmunoglobulinas G cationizadas y su posible aplicación en inmunoterapia), así como el uso de proteínas homólogas cationizadas como transportadores de péptidos, covalentemente unidos a ellas mediante enlaces fácilmente degradables una vez atravesada la barrera hematoencefálica (W.M. Pardridge et al 1990, *Endocrinology* 126:977 - 984; W.M. Pardridge et al 1990, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255:893 - 899). Si bien este proceso de transcitosis no se encuentra limitado al sistema nervioso central, representa un mecanismo semiespecífico, ya que incrementa el paso de dichas proteínas al cerebro en varios órdenes de magnitud en comparación con otros órganos, no afectando a la integridad de la barrera hematoencefálica y sin ocasionar efectos tóxicos colaterales, al menos en las condiciones experimentales en que han sido estudiadas (D. Triguero et al 1991, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258:186 - 192). No obstante, dicha aproximación presenta ciertos aspectos problemáticos en lo que concierne a su uso como vectores de péptidos, entre las que cabría destacar

la necesidad de transformar el péptido para su posterior unión covalente al vector cationizado (lo que implica un elevado riesgo de pérdida de actividad biológica), un escaso rendimiento en las reacciones de conjugación péptido - proteína y una limitación de la capacidad neta de transporte dado el gran tamaño del vector (albúmina en este caso).

5 Por otra parte, el uso de microencapsuladores moleculares en la industria química en general, y en la farmacéutica en particular, tiene en las Ciclodextrinas uno de sus más notorios representantes. Las ciclodextrinas son polímeros de glucosa, de estructura cíclica, producidos por algunas bacterias. Están constituidos por 6, 7 u 8 unidades (alfa -, Beta - y gamma - ciclodextrina, respectivamente) unidas por
10 enlaces glicosídicos 1 - 4, delimitando una cavidad central de diferentes tamaños. Las ciclodextrinas forman complejos con cualquier molécula no excesivamente polar que pueda penetrar total o parcialmente en su cavidad interior. La molécula huésped es retenida mediante el establecimiento de enlaces de van der Waals (y ocasionalmente puentes de hidrógeno) sin alterar la estructura química de la porción incluida. La liberación de dicha molécula se produce bien por la propia reversibilidad de la reacción de inclusión
15 bajo condiciones fisicoquímicas adecuadas, o por la rotura de los enlaces 1 - 4 que mantienen unidos los monómeros de glucosa, bien por acción de amilasas o en medios de un pH muy ácido (W. Saenger. 1980. Angew. Chem. Int. Ed. 19:344 - 362). Estas y otras características de las ciclodextrinas han generado un fuerte desarrollo en el estudio y utilización de las mismas, frecuentemente como mejoradores de sus características fisicoquímicas (vehículo de sustancias oleosas) o como estabilizadores de fármacos para
20 su absorción y transporte en sangre (W. Saenger. 1980. Angew. Chem. Int. Ed. 19:344 - 362; M.E. Brewster et al, 1989. J. Parenter. Sci. Tech. 43:231 - 240). La presencia de radicales químicamente activos orientados hacia el exterior de la cavidad central (especialmente los radicales hidroxilo primarios de la posición 6 de cada glucosa) ha permitido la realización de muy diversas transformaciones químicas tendientes a mejorar alguna de las características de las Ciclodextrinas, existiendo un amplio repertorio
25 de Ciclodextrinas modificadas y adaptadas a múltiples requerimientos específicos.

Se han sintetizado diversos haloderivados de azúcares mediante el uso de trialquilfosfinas en presencia de diferentes alquilhaluros, evitándose la formación final de ésteres monoalquílicos al restringir el uso de derivados fosfinicos a los compuestos trialquilo o triarilo, evitando el uso de trialkoxi iniciales (J.B. Lee
30 y T. Nolan, 1966, Can. J. Chem. 44:1331 - 1334). B. Castro et al (1972, Tetrahedron Lett. 49:5001 - 5004) han aplicado la trisdimetilaminofosfina para la activación selectiva del hidroxilo primario de la metil - alfa - ciclodextrina, en presencia de diferentes haluros y en disolventes apróticos, en un rango de temperaturas comprendido entre - 40°C y +80°C, con rendimientos que oscilan entre el 50% y el 100%. Además, estos autores han descrito la sustitución nucleofílica por grupos azido y amino, justificando la
35 necesidad de efectuar una posterior acetilación del producto bruto y su ulterior purificación como estrategia para separarlo mediante cromatografía instantánea de la hexametilfosfoniotriamida formada durante la reacción.

Asimismo, una gran variedad de haloderivados de nucleótidos ha sido obtenida en diferentes condiciones experimentales por J.H. Verheyden y J.G. Moffat (1972, J. Org. Chem. 37:2289 - 2299) mediante
40 el uso de trifenilfosfina y diferentes haluros en condiciones suaves (temperatura ambiente, empleo de disolventes apróticos) con elevados rendimientos.

La utilización de trialquilfosfinas como intermediarios para la sustitución nucleofílica de grupos hidroxilo en azúcares, ha sido empleada por T. Hata et al (1975, Chemistry Lett. 977 - 980) en presencia de
45 azida de litio para la obtención de 5' - azido - 5' - deoxirribonucleótidos bajo condiciones neutras, a temperatura ambiente y en presencia de disolventes apróticos con elevados rendimientos (superiores al 90%). Finalmente, J. Boger et al (1978, Helv. Chim. Acta 61:2190 - 2218) se han valido de la formación de sales de trifenilfosfonio en presencia de tetrabromuro de carbono y azida de litio en disolventes apróticos
50 para la obtención de 6 - azido derivados de alfa - y beta - ciclodextrinas, estando restringidas al hidroxilo en posición 6, con un grado de selectividad alcohol primario:alcohol secundario de 20:1 y 60:1 para alfa - y beta - ciclodextrina respectivamente, siendo los rendimientos de obtención del azoderivado del 25% y del 54% respectivamente. En el caso de la 6 - azido - alfa - ciclodextrina, la ulterior obtención de 6 - amino - alfa - ciclodextrina se ha realizado por 1) deacetilación con hidróxido potásico en presencia
55 de dioxano/metanol, con un rendimiento del 98% y 2) reducción con hidróxido amónico en presencia de trifenilfosfina en dioxano/metanol. Tras su neutralización con ácido clorhídrico diluido y eliminación al vacío del disolvente en presencia de pentóxido de fósforo, se obtiene el clorhidrato de 6 - amino - alfa - ciclodextrina. El rendimiento de esta segunda etapa es del 98%, por lo que el rendimiento global se sitúa en torno al 24%.

60 En el caso de la 6 - azido - beta - ciclodextrina éstos últimos pasos no se han llevado a cabo, pero no se prevén variaciones importantes tanto en los productos obtenidos como en sus rendimientos en condi-

ciones similares, por lo cual es previsible la obtención de 6 - amino - beta - ciclodextrina con rendimientos globales en torno al 50%.

Cabe destacar la enorme diferencia con otros procedimientos de obtención de amino derivados de beta - ciclodextrina mediante la utilización de tosilsulfonilo o mesitilsulfonilo derivados (S. Umezawa y K. Tatsuja, 1968, Bull. Chem. Soc. Jpn. 41:464 - 468; K. Tsujihara et al. 1977, Bull. Chem. Soc. Jpn. 50:1567 - 1571), con la frecuente ocurrencia de amino sustituciones en los grupos hidroxilo secundarios en posición 2 y 3 de la alfa - glucopiranososa en alfa - y beta - ciclodextrina, así como un rendimiento global que no supera el 1,2% en la mejor de las situaciones.

El acoplamiento de oligopéptidos a 6 - amino - beta - ciclodextrina (obtenida mediante la utilización de mesitilsulfonilos) ha sido llevado a cabo por Ekberg et al. (1989, Carbohydrate Res. 192:111 - 117), utilizando como activador del alfa - carbonilo del oligopéptido, dicitclohexilcarbodiimida en presencia de 1 - hidroxibenzotriazol, en disolventes apróticos y a temperatura ambiente. Estos autores han llevado a cabo un acoplamiento con una relación estequiométrica oligopéptido:6 - amino - beta - ciclodextrina de 1:1 al hacer reaccionar un equivalente molar de cada uno de los reactivos, no siendo éste el objetivo de la presente invención ya que lo que se pretende alcanzar en la misma es el grado máximo de acoplamiento de aminoácido: 6 - amino - beta - ciclodextrina con el fin de proporcionar la carga eléctrica más elevada al complejo final.

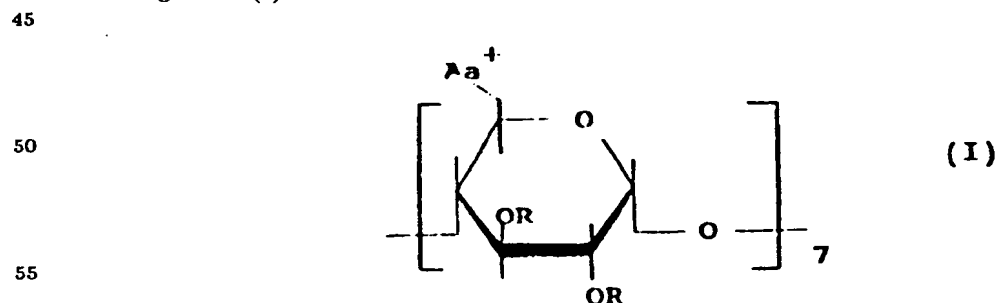
La liberación de los grupos protectores se puede realizar por acidólisis mediante ácido trifluoroacético - diclorometano, para los grupos protectores butiloxycarbonilo (previamente realizada por B. Ekberg et al. (1989, Carbohydrate Res. 192:111 - 117) o mediante ácido hidrobromico en ácido acético para grupos protectores benciloxycarbonilo.

Breve descripción de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la obtención de derivados de beta - ciclodextrina dotados de una carga eléctrica positiva mediante la unión covalente de aminoácidos básicos, así como nuevos derivados de beta - ciclodextrina que pueden ser utilizados como vectores de fármacos de transporte cerebral restringido debido a la barrera hematoencefálica. El procedimiento implica la obtención de aminoderivados de beta - ciclodextrina, restringiendo la presencia de grupos amino a la posición 6 de cada monómero de alfa - glucopiranososa, siendo éste posteriormente reducido a un grupo amino primario. La unión de aminoácidos básicos (arginina y lisina preferentemente), cuyos grupos guanidino y amino se encuentran protegidos, se lleva a cabo tras la activación del grupo alfa - carbonilo del aminoácido en presencia de dicitclohexilcarbodiimida, estableciéndose un enlace tipo amida con el aminoderivado de la beta - ciclodextrina. La eliminación de los grupos protectores laterales de los aminoácidos básicos se realiza por acidólisis.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un procedimiento para la obtención de derivados de beta - ciclodextrina dotados de una carga eléctrica positiva elevada mediante la unión covalente de aminoácidos básicos, de fórmula general (I)



donde

R puede ser H o un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono; y

Aa⁺ es el resto de un aminoácido básico.

La expresión grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono, en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere a restos de hidrocarburos de cadena lineal ramificada que contienen de 1 a 4 átomos de carbono.

La expresión resto de un aminoácido básico, en el sentido utilizado en esta descripción, se refiere al resto de un aminoácido básico (Arginina, Lisina o Histidina) resultante de la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo del aminoácido y el grupo amino del aminoderivado de beta - ciclodextrina.

El procedimiento de la presente invención puede ser ilustrado mediante el siguiente esquema de reacción

15

20

25

30

35

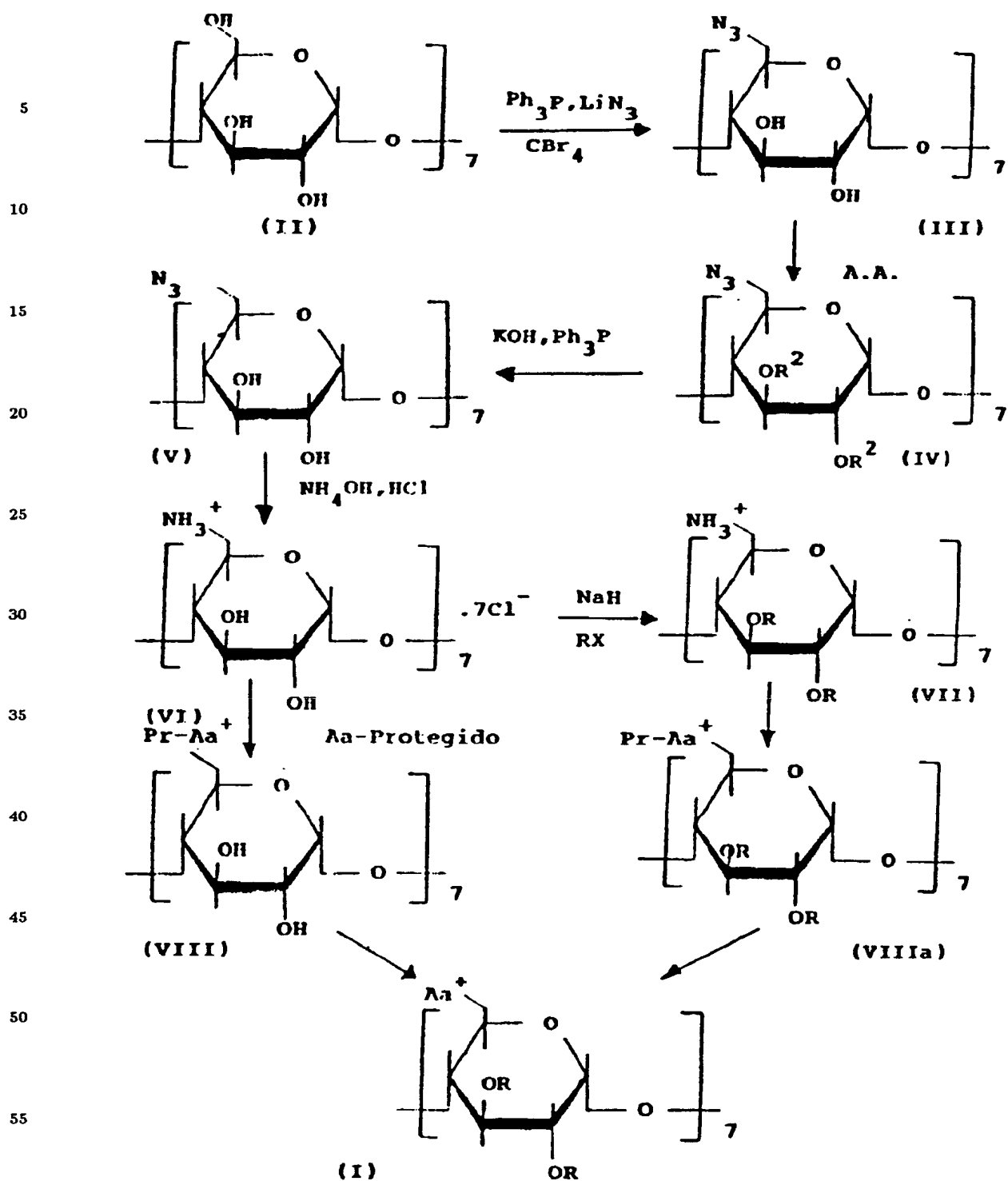
40

45

50

55

60



Como puede apreciarse el procedimiento de la invención comprende básicamente las etapas siguientes:

a) Obtención de los aminoderivados de beta - ciclodextrina; y

5 b) Acoplamiento del aminoácido básico con el aminoderivado de beta - ciclodextrina, seguido de desprotección de los grupos protectores laterales presentes en la cadena del aminoácido;

que se describen con mayor detalle a continuación.

10 Como puede apreciarse en el esquema de reacción anterior, la sustitución nucleofílica de un grupo hidroxilo por un grupo azido se lleva a cabo poniendo en contacto la beta - ciclodextrina (II) con trifenílfosfina (Ph_3P), tetrabromuro de carbono (CBr_4) y azida de litio (LiN_3) en un disolvente aprótico inerte a la reacción tal como dimetilformamida (DMF) preferentemente, aunque otros disolventes apróticos tales como dimetilacetamida (DMA), N - metilpirrolidona (NMP), dimetilsulfóxido (DMSO), acetonitrilo (ACN) o sulfolano también pueden ser utilizados. Se utilizan relaciones estequiométricas de 1:7 para 15 beta - ciclodextrina:trifenilfosfina: tetrabromuro de carbono, siendo de 5 a 6 veces mayor (35 - 40) para la azida de litio. La reacción se efectúa a una temperatura comprendida entre 15° y 50°C, preferentemente a temperatura ambiente y durante todo el curso de la misma (aproximadamente entre 6 y 10 horas) se mantienen condiciones anhidras y protección con atmósfera inerte. La reacción se detiene mediante 20 adición de un exceso de alcohol, preferentemente metanol, recuperándose el producto por lavados sucesivos seriados con agua, metanol y éter de petróleo, eliminándose cada disolvente por evaporación antes de su reconstitución en el siguiente.

25 El producto obtenido (III) está constituido por una mezcla de isómeros con diferentes grados de sustitución y en el curso de la reacción se forma hexametilsfosfonotriamida como subproducto. Para la eliminación de éste subproducto así como para la separación de los isómeros es necesario someter el producto obtenido a un ciclo de acetilación, separación y posterior deacetilación.

30 La acetilación se realiza poniendo en contacto el producto (III) obtenido con anhídrido acético en presencia de piridina anhidra, en atmósfera inerte y a una temperatura comprendida entre 40° y 70°C, preferentemente a 50°C. El producto acetilado puede ser recuperado mediante lavados sucesivos con benceno, ácido clorhídrico diluido y agua, obteniéndose un producto final (IV) en el que los grupos hidroxilo de las posiciones 2 y 3 se encuentran acetilados ($\text{R} = -\text{O}-\text{CO}-\text{CH}_3$) tras su paso por una columna de 35 Sílica Gel utilizando benceno/etanol como solvente.

La deacetilación del producto (IV) se realiza mediante tratamiento con hidróxido potásico en presencia de trifenílfosfina en un disolvente adecuado tal como el formado por dioxano/metanol/agua. La reacción se apaga mediante adición de ácido clorhídrico y el producto resultante (V) se recupera con cloroformo y posterior lavado del precipitado obtenido con agua. Una vez desecado el producto resultante (V), éste 40 se somete a una reducción con hidróxido amónico en presencia de trifenílfosfina en dioxano/metanol en atmósfera inerte a una temperatura comprendida entre 15° y 40°C preferentemente a temperatura ambiente durante un periodo de tiempo comprendido entre 10 y 14 horas. Una vez eliminado el disolvente por desecación, el producto obtenido se neutraliza con ácido clorhídrico y se somete a lavados con agua, eliminándose la fase orgánica y concentrando el producto final por desecación al vacío, obteniéndose un 45 producto de fórmula (VI). A partir de este producto (VI), si se desea, pueden obtenerse los correspondientes alcoxiderivados (VII) por tratamientos de dicho producto (V) con los respectivos haluros de alquilo en presencia de una base tal como hidruro sódico en disolventes apróticos inertes antes de continuar con el resto del procedimiento.

50 El producto (VI), en forma de clorhidrato, se pone en contacto con los aminoácidos básicos (arginina o lisina preferentemente) provistos de protección lateral en sus grupos guanidino o amino por medio de grupos protectores adecuados tales como benciloxicarbonilo (CBZ) o butiloxicarbonilo (BOC), diciclohexilcarbodiimida (DCCI) como activador intermedio del grupo carbonilo del aminoácido y 1 - hidroxibenzotriazol (HOBT) en un disolvente aprótico tal como DMF o cualquier otro disolvente aprótico apropiado. 55 La reacción puede efectuarse a una temperatura comprendida entre 15° y 40°C, preferentemente a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo comprendido entre 14 y 20 horas aproximadamente y en atmósfera inerte. Al objeto de conseguir el máximo grado de acoplamiento se debe mantener una relación estequiométrica entre 6 - amino - beta - ciclodextrina (VI) y el resto de los reactivos igual o superior a 1:7 respectivamente, si bien, no se descarta la posibilidad de que restricciones estéricas en la formación del 60 enlace amida impidan la obtención del complejo heptakis - 6 - aminoácido - deoxi - beta - ciclodextrina. La purificación del producto (VIII) se realiza mediante una columna Sephadex utilizando el sistema metanol:agua (3:7) como solvente. Operando con los productos de fórmula (VII) de la misma manera que

con los productos de fórmula (VI) se pueden obtener los correspondientes derivados (VIIIa) sustituidos en las posiciones 2 y 3 de las unidades de glucopiranosas. La eliminación de los grupos protectores presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos acoplados a los derivados de beta - ciclodextrina (VIII) y (VIIIa) se lleva a cabo mediante acidólisis siguiendo técnicas habitualmente utilizadas en la síntesis de péptidos, variando el protocolo a emplear en función de los grupos protectores presentes en el aminoácido, obteniéndose los derivados de beta - ciclodextrina de fórmula general (I).

A continuación se describen algunos Ejemplos que sirven para ilustrar el procedimiento de la presente invención sin que deban ser considerados en sentido limitativo del alcance de la misma.

10 Ejemplo 1

Heptakis (6 - azido - 6 - deoxi) - Beta - ciclodextrina tetradeca (2,3) acetato.

15 En 30 ml de dimetilformamida se disuelven 1.01 mmoles de beta - ciclodextrina, 36 mmoles de azida de litio y 7.13 mmoles de trifenilfosfina. A esta solución se añaden 7.16 mmoles de tetrabromuro de carbono, observándose una ligera producción de calor. La mezcla anterior se mantiene con agitación durante 8 horas, a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno. La reacción se apaga con 5 ml de metanol y, transcurridos 15 minutos, el volumen es reducido a la mitad mediante vacío, hasta obtener una solución viscosa de color amarillo que es añadida a 40 ml de agua. El precipitado formado es lavado con 150 ml de agua dos veces y desecado al vacío sobre pentóxido de fósforo durante 48 a 72 horas. El precipitado se disuelve en 150 ml de metanol a 30°C bajo agitación, durante 16 horas, añadiendo tras ese tiempo, 50 ml de éter de petróleo. Tras eliminar completamente los solventes mediante vacío, en presencia de pentóxido de fósforo, el producto se disuelve en 15 ml de piridina seca, a la que se añaden 7 ml de anhídrido acético, manteniendo la mezcla a 50°C durante 8 horas, con agitación y en atmósfera de nitrógeno. 25 Tras evaporación al vacío, el residuo resultante se disuelve en 50 ml de benceno, procediéndose al lavado de la solución con 50 ml de ácido clorhídrico al 10%. Se procede posteriormente a la eliminación de la fase acuosa y se repite el lavado con clorhídrico dos veces más. La solución final se somete a un lavado con agua (50 ml), el cual se repite tres veces, siendo posteriormente desecada sobre sulfato magnésico, seguido de filtración y evaporación del solvente orgánico al vacío. El producto obtenido se purifica por cromatografía instantánea en sílica con benceno:etanol (16:1). El rendimiento de este método es de un 54% según el método de J. Boger et al (1978, Helv. Chim. Acta 61:2190 - 2218).

Ejemplo 2

35 *Heptakis (6 - azido - 6 - deoxi) - Beta - ciclodextrina.*

Se disuelve 1 mmol del producto obtenido en el Ejemplo 1 en 300 ml de dioxano. A esta solución se añaden 30 ml de metanol, 10 ml de agua y 25 - 30 mmoles de hidróxido potásico, a temperatura ambiente y bajo agitación, tomando la solución un aspecto lechoso, con formación de un precipitado blanco. 40 Después de transcurridos 30 minutos, se añaden 25 ml de agua para clarificar la solución, manteniendo la agitación durante 60 - 70 minutos. La reacción es apagada con ácido clorhídrico 1N y desecada a vacío. El residuo blanco obtenido es extraído con 300 ml de cloroformo, filtrado y resuspendido en 200 ml de cloroformo fresco, bajo agitación y durante una hora, tras lo cual es filtrado de nuevo y desecado al vacío. 45 Este material insoluble en cloroformo es resuspendido en 300 ml de agua, agitando durante 30 minutos y filtrado de nuevo, repitiéndose el proceso de lavado con otros 100 ml de agua. El producto final, insoluble en cloroformo y agua, es desecado completamente, al vacío, sobre pentóxido de fósforo.

El rendimiento de este ejemplo es del 98% según el protocolo descrito por J. Boger et al (1978, Helv. Chim. Acta 61:2190 - 2218).

Ejemplo 3

Heptakis (6 - amino - 6 - deoxi) - Beta - ciclodextrina heptahidrocloruro.

55 Se disuelve 1 mmol del producto obtenido en el Ejemplo 2 en 100 ml de dioxano más 20 ml de metanol, produciéndose una solución de aspecto lechoso a la que se añade, bajo agitación y atmósfera de nitrógeno, 21 mmoles de trifenilfosfina, con desarrollo de burbujas de gas. Se mantiene la agitación durante una hora, hasta que la solución toma un aspecto claro, añadiéndose entonces 5 ml de una solución concentrada de hidróxido amónico gota a gota. La solución se mantiene en las mismas condiciones anteriores durante 12 horas, tras lo cual los solventes son eliminados al vacío. El producto es resuspendido en 50 ml de agua y neutralizado con ácido clorhídrico 1N y 0.1N hasta alcanzar un pH de 4. La suspensión anterior es

lavada con 100 ml de benceno para eliminar el óxido trifenilfosfínico (soluble en benceno) y la fase acuosa es liofilizada y posteriormente desecada al vacío sobre pentóxido de fósforo.

El rendimiento de este ejemplo es del 97% según el protocolo descrito por J. Boger et al (1978, Helv. Chim Acta 61:2190 - 2218).

Ejemplo 4

Heptakis (6 - trisbenciloxycarbonil - L - Arginina) - Beta - ciclodextrina.

A 5 ml de dimetilformamida se añaden 0.1 mmoles del producto obtenido en el Ejemplo 3, 0.7 mmoles de trisbenciloxycarbonil - L - Arginina, 0.7 mmoles de dicitlohexilcarbodiimida (DCCI) y 0.7 mmoles de 1 - hidroxibenzotriazol (HOBt) bajo agitación, en atmósfera inerte y a temperatura ambiente, durante 16 horas. La solución es filtrada y concentrada al vacío, procediéndose a la obtención del producto final por cromatografía instantánea en Sephadex G - 10 con metanol:agua (3:7).

Ejemplo 5

Heptakis (6 - dibenciloxycarbonil - L - lisina) - Beta - ciclodextrina.

El producto del título se prepara siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4 pero utilizando dibenciloxycarbonil - L - lisina como aminoácido protegido, siendo éste acoplado al amino - derivado de la beta - ciclodextrina.

Ejemplo 6

Heptakis (6 - dibutiloxycarbonil - L - lisina) Beta - ciclodextrina.

El producto del título se prepara siguiendo el procedimiento del Ejemplo 4 pero utilizando L - lisina con protección lateral por el grupo butiloxycarbonilo.

Trabajando según el procedimiento de los Ejemplos anteriores es posible obtener derivados con acoplamiento de arginina y/o lisina con protección aminolateral mixta por grupos benciloxi - o butiloxycarbonilo.

Ejemplo 7

Heptakis (6 - L - Arginina) - Beta - ciclodextrina y Heptakis (6 - L - Lisina) - Beta - ciclodextrina.

La liberación de los grupos protectores benciloxycarbonilo de los productos obtenidos en los Ejemplos 4, 5 y 6 se realiza mediante acidólisis con ácido hidrobromico al 33% en ácido acético, de acuerdo con los métodos descritos por M. Bodanszky y A. Bodanszky en "The Practice of Peptide Synthesis". Springer - Verlag. Berlin. 1984.

Ejemplo 8

Heptakis (6 - L - Lisina) - Beta - ciclodextrina.

La liberación de los grupos protectores butiloxycarbonilo de los productos obtenidos en el Ejemplo 6 se realiza mediante acidólisis con ácido trifluoroacético - diclorometano o ácido trifluoroacético - tioanisol, de acuerdo con los métodos descritos por M. Bodanszky y A. Bodanszky en "The Practice of Peptide Synthesis". Springer - Verlag, Berlín. 1984.

Ejemplo 9

Heptakis (6 - azido - 6 - deoxi) tetradeca (2,3) - O - metil - beta - ciclodextrina.

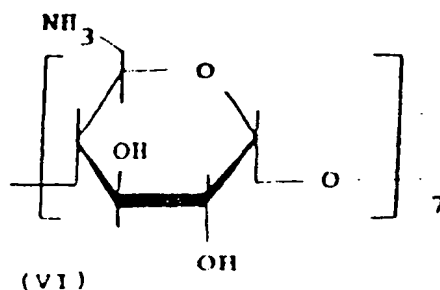
Aproximadamente 0.2 mmoles del producto obtenido en el Ejemplo 2 se disuelven en 100 ml de dimetilformamida en un matraz dotado de condensador de reflujo y colocado en atmósfera de nitrógeno con presión negativa. El matraz es colocado, bajo agitación, en un baño de diclorometano para mantener la reacción a temperatura ambiente. A esta solución se añaden 15 mmoles de hidruro sódico cristalino y 30 mmoles de yoduro de metilo. La reacción es protegida de la luz y se mantiene en agitación durante 4 horas. La solución resultante, de aspecto claro y con un precipitado de hidruro sódico en exceso, es

evaporada bajo nitrógeno, protegida de la luz, hasta unos 90 ml. Esta solución es filtrada rápidamente y se reduce su volumen hasta 50 ml por evaporación en corriente de nitrógeno. La suspensión resultante es añadida a 300 ml de agua/hielo, siendo agitada vigorosamente y posteriormente filtrada. El precipitado obtenido es desecado al vacío sobre pentóxido de fósforo. El rendimiento obtenido en este ejemplo es del 92% según el protocolo descrito por J. Boger et al (1978, Helv. Chim. Acta 61:2190 - 2218). El producto obtenido puede ser utilizado como producto de partida en sustitución de heptakis (6 - azido - 6 - deoxi) - beta - ciclodextrina en los Ejemplos 3 y siguientes, al objeto de obtener complejos con metilderivados de beta - ciclodextrina.

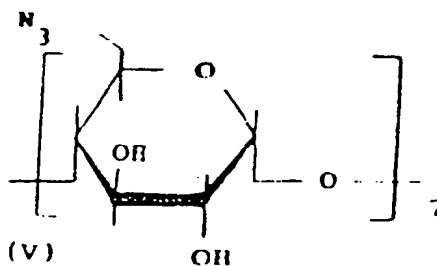
El grado de pureza de los productos contemplados en todos los ejemplos anteriores es determinado rutinariamente mediante cromatografía en capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice, así como por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con resinas de exclusión de tamaño y de intercambio iónico. La composición de los solventes utilizados en TLC y en HPLC son variados, adecuándose a las características de cada uno de los productos así como los adecuados a cada tipo de resina en el caso de su análisis mediante HPLC. Asimismo, se determina para cada uno de los productos contemplados en los ejemplos anteriores, el ángulo de rotación óptica mediante polarimetría y sus espectros de absorción en los rangos de luz ultravioleta y visible. Finalmente, los productos de los ejemplos 7, 8 y 9 son más ampliamente caracterizados determinando su peso molecular mediante espectrometría de masas y otras características físicas tales como curvas de solubilidad, curvas de pH, viscosidad aparente y conductividad eléctrica, dado su interés como parámetros utilizados como control en los procedimientos de encapsulación de fármacos.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la obtención de 6 - aminoderivados de beta - ciclodextrina de fórmula general (VI)



- 20 **caracterizado** porque comprende la reducción del correspondiente 6 - azido derivado de beta - ciclodextrina, de fórmula general (V)

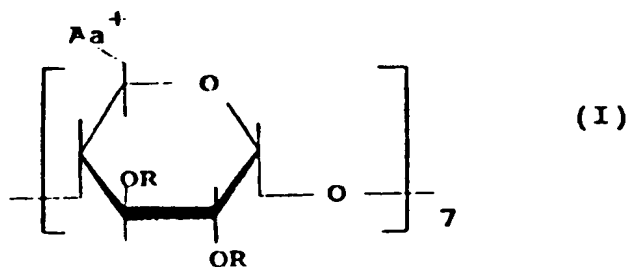


con hidróxido amónico, en atmósfera inerte y en presencia de trifenilfosfina y de un disolvente adecuado, seguido de neutralización con ácido clorhídrico.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque como disolvente se utiliza una mezcla constituida por dioxano y metanol.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se efectúa a una temperatura comprendida entre 15 y 40°C, preferentemente a temperatura ambiente.

- 45 4. Procedimiento para la obtención de derivados de beta - ciclodextrina de fórmula general (I)



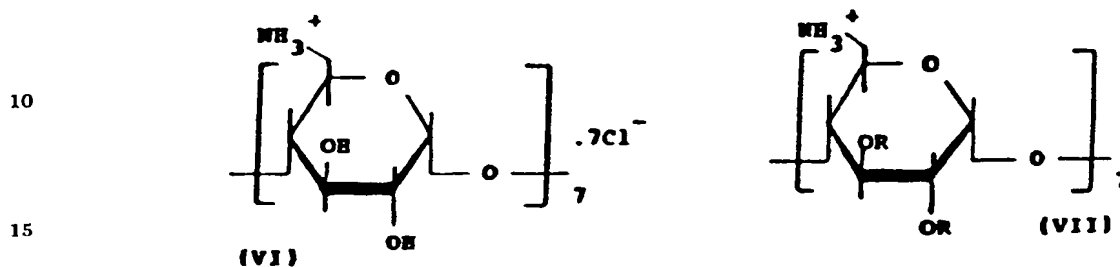
60 donde

R puede ser H o un grupo alquilo de 1 a 4 átomos de carbono; y

Aa^+ es el resto de un aminoácido básico;

caracterizado porque comprende hacer reaccionar un 6 - aminoderivado de ciclodextrina de fórmula general (VI) o (VII)

5



con un aminoácido básico dotado de protección lateral en sus grupos amino o guanidino, en atmósfera inerte y en presencia de dicitohexilcarbodiimida y 1 - hidroxibenzotriazol, en un disolvente aprótico.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque se efectúa a una temperatura comprendida entre 15 y 40°C, preferentemente a temperatura ambiente.

6. Procedimiento según la reivindicación 4, caracterizado porque la relación estequiométrica entre los productos de fórmulas (VI) o (VII) y el resto de los reactivos es igual o superior a 1:7 respectivamente.

30

35

40

45

50

55

60



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ ES 2 053 399

⑫ N.º solicitud: 9300028

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 11.01.93

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁵: C08B 37/16

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BASE DE DATOS WPIL, n.º acceso 88-011433, 1988, Derwent Publ. Ltd., London GB & JP-A-62275102 (NIPPON SHOKUHHIN KAK KK) 30.11.1987 * Resumen *	1
A	TETRAHEDRON LETTERS, n.º 49, 1972, Great Britain; CASTRO y col.: "Sels d'alkyloxyphosphonium III - Activation selective de l'hydroxide primaire du methyl, Ó-D-Glucopyrannoside", pg. 5001-5004	1
A	BASE DE DATOS WPIL, n.º acceso 89-104148, 1989, Derwent Publ. Ltd., London GB & JP-A-01051402 (TOYO SODA MFG KK) 27.02.1989	4,5,6
A	EP-A-0499322 (JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.) * Todo el documento *	1-6
A	WO-A-9200331 (THE UNITED STATES OF AMERICA) * Todo el documento *	1-6
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado <input checked="" type="checkbox"/> para todas las reivindicaciones <input type="checkbox"/> para las reivindicaciones n.º:		
Fecha de realización del informe 18.02.94	Examinador E. Albarrán Gómez	Página 1/1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ ~~FADED~~ TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)